

Ano lectivo 2011/2012

Relatório final de estágio de iniciação à investigação científica

Centro Biologia Aplicada à Agricultura

# **Influência do fotoperíodo na ontogenia dos tricomatas de *Lavandula pedunculata* (alfazema): caracterização histoquímica**



Mariana Pereira Maia da Silva

Orientadora: Doutora Ana Caperta

Co-orientadora: Doutora Generosa Teixeira

Lisboa, 2012

## Índice

Resumo/Abstract .....	3
1.Introdução .....	3
2.Objectivos .....	3
3.Material e métodos .....	5
3.1 Material vegetal .....	5
3.2 Condições de crescimento .....	5
3.3 Microscopia óptica de fluorescência (MOF) .....	6
3.4 Testes histoquímicos .....	6
4.Resultados .....	8
4.1 Condições de controlo .....	8
4.2 Regime fotoperiódico 12h luz, 12h escuro .....	9
4.3 Regime fotoperiódico 8h luz, 16h escuro .....	10
5.Discussão .....	11
6.Referências bibliográficas .....	13

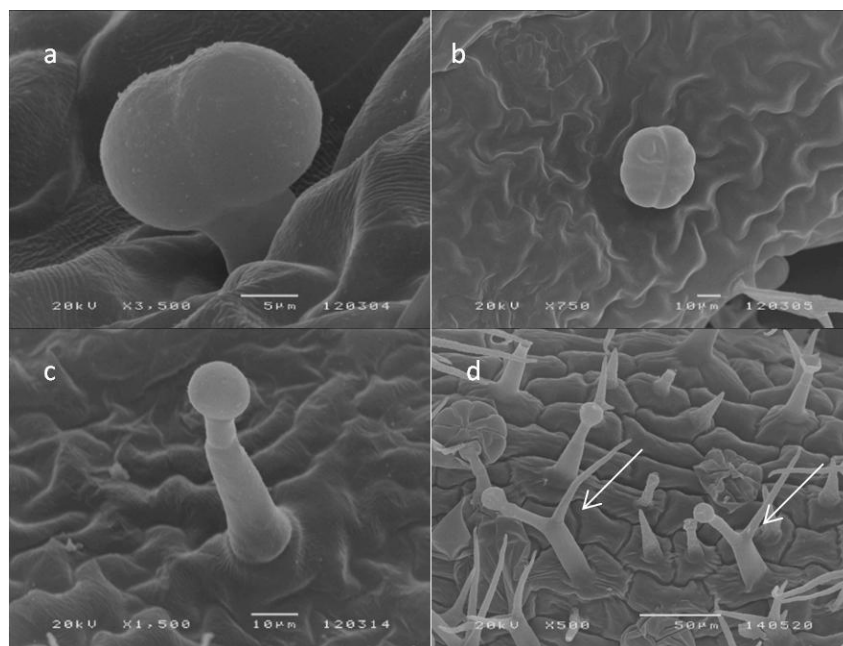
Neste estudo foi realizada uma caracterização histoquímica dos tricomas glandulares em plântulas de *Lavandula pedunculata* (Miller) Cavanille expostos a 3 regimes fotoperiódicos diferentes: 16h luz/ 8h escuro (para controlo), 12h luz/12h escuro e ainda 8h luz/16h escuro. Pretendemos perceber se alterações no regime fotoperiódico modificam a composição das secreções dos tricomas. Para avaliar as diferenças entre regimes, foram realizadas uma bateria de testes histoquímicos e de fluorescência. Observou-se uma diminuição de produção de secreções quantita e qualitativamente.

In this study we performed a histochemical characterization of glandular trichomes in plantules of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cavanille exposed to three different photoperiodic regimes: 16h light/8h dark (to control), 12h light/12h dark and still 8h light/16h dark. We aim at understanding whether changes in photoperiodic regime can modify the composition of the secretions of the trichomes. To evaluate the differences between the regimes we were carried a battery of fluorescence and histochemical tests. It was found that there are significant changes in the segregations, mainly characterized by reduced production of secretions even quantitatively and qualitatively.

## **1.Introdução**

A família *Lamiaceae* Martinov é uma das famílias de plantas com maior interesse económico, conhecida também como a família das aromáticas, em parte pela produção de secreções com fragância e pela acumulação de óleos essenciais produzidos por tecidos secretores. A maioria das plantas desta família tem usos medicinais aromáticos e terapêuticos desde a antiguidade. (Feijão, 2011). Dentro desta família podemos encontrar, entre outros, o género *Lavandula* L. que apresenta com 39 espécies com vasta distribuição no globo (Feijão, 2011).

A *Lavandula pedunculata* (Miller) Cavanille é uma espécie que em Portugal podemos encontrar nas regiões do Alto Alentejo, Algarve, Beira Alta, Baixo Alentejo, Beira Baixa, Beira Litoral, Douro Litoral, Estremadura, Minho e Trás-os-Montes (Alto Douro) (Feijão, 2011). As plantas desta espécie possuem estruturas secretoras, neste caso tricomas secretores de vários tipos, nomeadamente tricomas capitados tipo I, tipo II e tipo III, tricomas peltados e mesmo alguns tricomas mistos (Figura 1).



**Figura 1:** **a)** Tricoma secretor capitado tipo I da folha de *Lavandula pedunculata* (Miller), MEV;  
**b)** Tricoma secretor peltado da folha de *Lavandula pedunculata* (Miller), MEV;  
**c)** Tricoma secretor capitado tipo II da folha de *Lavandula pedunculata* (Miller), MEV;  
**d)** Tricomas secretores mistos (setas) da folha de *Lavandula pedunculata* (Miller), MEV.  
 (Imagens cedidas por Doutora Generosa Teixeira)

Morfologicamente estes tricomas são essencialmente constituídos por uma base, um pedúnculo e uma cabeça, onde se acumulam as secreções. Nos tricomas peltados a célula terminal divide-se sucessivamente de modo radial até atingir no máximo 18 células, sendo a célula do pedúnculo é muito reduzida (Moreira, 2010). Podemos distinguir em vários tipos de tricomas capitados consoante o número de células do pedúnculo e também pela forma da cabeça: capitados tipo I, tipo II e tipo III (Moreira, 2010). O primeiro tipo que tem uma célula basal, uma ou duas células pedunculares e uma cabeça também com uma a duas células de forma circular ou periforme (Moreira, 2010). O segundo tipo de tricomas tem uma célula basal cônica, um pedúnculo com uma ou duas células e uma cabeça alongada ou redonda (Moreira, 2010). Por fim, o terceiro tipo pode ter um pedúnculo que tem até 5 células e uma cabeça em forma de uma taça (Moreira, 2010). A morfologia dos tricomas pode ter influência na acumulação de secreções, por exemplo os tricomas peltados têm uma cabeça maior o que lhes permite acumular mais secreção comparativamente com os outros tricomas.

As secreções produzidas pelos tricomas têm funções várias como atração ou repulsão de insetos que podem ser polinizadores ou predadores. Por exemplo os alcalóides produzidos pelas plantas são tóxicos para os herbívoros e os terpenóides são repelentes olfativos para a

maioria dos insetos (Corsi, 1999). Os óleos essenciais produzidos têm bastante interesse a nível de várias indústrias. Estes óleos têm uma composição química muito variada e complexa, normalmente de lípidos, polissacáridos, terpenos e outros (Feijão, 2011). É um equilíbrio de todos os componentes do óleo que lhe confere as suas propriedades.

Para além dos óleos estas plantas sintetizam também vários metabolitos secundários que podem ser detetados pelos testes histoquímicos, como alcalóides, fenóis, ortodihroxifenóis e mucilagens que não têm diretamente papel no desenvolvimento da planta (Moreira, 2010), mas são produzidos devido à função ecológica de comunicação e defesa em resposta a condições de *stress*, a ataques de herbívoros e para atração de polinizadores (Trapp e Croteau, 2001) Pode ainda proteger contra excessos de radiação. A ausência de metabólitos secundários não resulta na morte da planta mas sim em pequenas alterações, só a longo prazo podem por em causa a fecundidade e sobrevivência da planta (Moreira, 2010).

São vários os fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento das plantas na Natureza, nomeadamente o fotoperíodo que influencia a germinação e a floração. A *Lavandula pedunculata* é uma planta de dia longo, e a sua floração ocorre em regimes fotoperiódicos de 16h luz de luz/8h de escuro. É então possível que se alterarmos o fotoperíodo, aumentando-o ou diminuindo-o, possamos causar diferenças nas estruturas da planta, inclusive na produção de secreções.

## **2.Objetivos**

Com o presente trabalho pretende-se perceber em que medida o fotoperíodo influencia a produção de secreções pelos tricomas de plântulas de *Lavandula pedunculata*. Para tal as plântulas foram submetidas a dois regimes fotoperiódicos diferentes daquele a que se encontram normalmente expostas na Natureza, com a finalidade de diminuir o número de horas de luz a que as plântulas se encontram expostas na natureza. Como fonte de avaliação das diferenças ao nível das secreções dos tricomas foram realizados os testes histoquímicos e observações de fluorescência.

## **3.Materiais e métodos**

### **3.1Material vegetal:**

Neste ensaio foram utilizadas sementes de *Lavandula pedunculata* (Miller) colhidas Mata Nacional de Escaroupim (Salvaterra-de-Magos), nos meses de Maio, Julho e Setembro de 2011, bem como de plantas semeadas em vaso no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, ISA, UTL, Lisboa. Vouchers foram depositados e identificados no Herbário do ISA (LISI, 164/ 2011).

### **3.2 Condições de crescimento:**

Para o ensaio de controlo, as sementes, 200 sementes, foram colocadas a germinar em vasos com substrato universal autoclavado, numa fitoclima (Rumed) com temperatura constante de 21°C e 16h de luz e 8h de escuro, para promover a germinação. Os vasos foram regados cerca de 3 vezes por semana. Para os ensaios de regime fotoperiódicos foram escolhidos dois tipos de regime: 12h luz/12h escuro e também 8h luz/16h escuro, tendo sido mantida a temperatura e o sistema de rega semelhantes ao controlo. Cerca de 10 plântulas foram expostas ao novo regime fotoperiódico após 8 dias germinando nas condições de controlo. A duração da exposição aos diferentes regimes fotoperiódicos foi de: 12h luz/ 12h escuro por 10 dias, 23 dias e 33 dias; e no regime de 8h luz/16h escuro foram 26 dias.

### **3.3 Microscopia óptica de fluorescência (MOF): autofluorescência e fluorescência induzida**

Para estas observações foi utilizado material fresco (cotilédones, 1ª, 2ª e 3ª folhas) cortado manualmente com o auxílio de uma lâmina de barbear e visualizado através de uma lupa Zeiss Stem 2000-C. De seguida os cortes foram montados em lâmina-lamela com água e posteriormente foi observada a autofluorescência com os seguintes filtros de excitação de UV (340-380nm) e luz azul (450-490nm).

Foi ainda observada fluorescência induzida com os seguintes compostos: solução New, solução aquosa de cloreto de alumínio a 15 %, solução etanólica de cloreto de alumínio a 5%, solução aquosa de acetato neutro de chumbo a 2% e por fim solução metanólica de acetato de magnésio a 5% (Godwin,1953; Gadek *et al.*,1984).

Todas as observações foram feitas com um microscópio de epifluorescência Olympus BX 60.

### **3.4 Testes histoquímicos:**

Todo o material vegetal acima referido (1ª, 2ª e 3ª folhas) foi sujeito a uma bateria de testes histoquímicos descritos detalhadamente abaixo, tendo estes sido realizados no fim de cada regime fotoperiódico. Todas as observações foram realizadas num microscópio Olympus BX 60.

Para a deteção de ortodihidroxifenóis os cortes foram colocados na lâmina onde se colocou uma solução aquosa de cloreto de ferro III a 10% (Johansen, 1940) durante 10 minutos. Após esta ação os cortes foram lavados com água e montados em lâmina-lamela com água. Para o resultado positivo deste teste os tricomas coraram negro-acastanhado.

Para detetar fenóis com OH livre/taninos usamos nos cortes vegetais uma solução de dicromato de potássio a 10% (Johansen, 1940) durante 10 minutos tendo sido os cortes lavados e montados em água. O resultado positivo foi a coloração de tricomas castanho alaranjado.

Com o fim de detetar alcalóides usamos o reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg, 1981) durante 10 minutos seguido de lavagem e montagem em água. Os tricomas coraram castanho avermelhado caso o resultado seja positivo.

Na deteção de mucilagens colocaram-se os cortes em contacto com uma solução aquosa de ácido tânico a 5% (Pizzolato e Lillie, 1973) durante 10-20 minutos. Seguiu-se uma lavagem em água durante 5-10 minutos de onde os cortes passaram para uma solução aquosa de tricloreto de ferro a 3% durante 10-20 minutos. De seguida procedeu-se a uma lavagem e montagem em água. Caso seja positivo os tricomas coraram de negro.

Para detetar polissacáridos colocaram-se os cortes numa lâmina com ácido periódico a 1% (Feder e O'Brien, 1968) durante 10 minutos seguidos de uma lavagem em água. De seguida foram transferidos 30 minutos para o escuro com o reagente de Schiff. Depois os cortes foram lavados com metabissulfito de sódio 0.5% durante 30 minutos. Antes da montagem em água os cortes foram lavados 3 vezes e durante 2 minutos cada em água. Quando o teste for positivo os tricomas coraram rosa vivo.

Na deteção de lípidos foi usado o vermelho sudão III a 0.3% em etanol 70% (Johansen, 1940). Assim os cortes foram colocados nesta solução durante 15 minutos seguidos de uma lavagem rápida com etanol a 70%. Depois foram montados em água, esperando-se que os tricomas corem de vermelho alaranjado. Para a distinção entre lípidos neutros e ácidos usou-se o sulfato azul do Nilo a 1% (Granter e Jollés, 1970) onde os cortes ficaram mergulhados durante 2 minutos. De seguida são colocados em ácido acético 1% durante 2 minutos. Seguiu-se a lavagem e montagem em água. Os tricomas com lípidos neutros coraram rosa e com lípidos ácidos coraram de azul.

Para detetar óleos essenciais usou-se o reagente de Nadi (David e Carde, 1964) onde os cortes ficaram 60-90 minutos. De seguida foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7, durante 2 minutos. Por fim foram montados em água. Caso os tricomas contenham óleos essenciais estes coraram de azul.

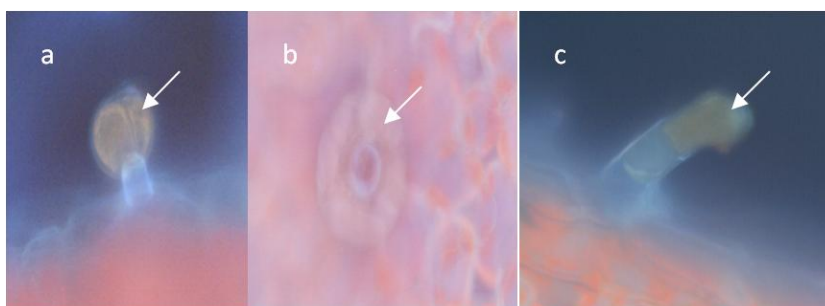
Na detecção de esteróides os cortes foram montados diretamente numa solução saturada de tricloreto de antimônio em ácido perclórico 60% (Mace *et al.*, 1974). Ao fim de 5-10 minutos os tricomas coraram de vermelho alaranjado.

Para detetar terpenóides os cortes foram colocados numa solução saturada de 2,4 dinitrofenihidrazina em HCl 2N, a 25°C (Granter e Jollés, 1969, 1970) durante 10 minutos. De seguida foram lavados e montados em água. Os tricomas coraram vermelho alaranjado, se o resultado for positivo.

## 4.Resultados

### 4.1 Controlo (16luz/8h escuro):

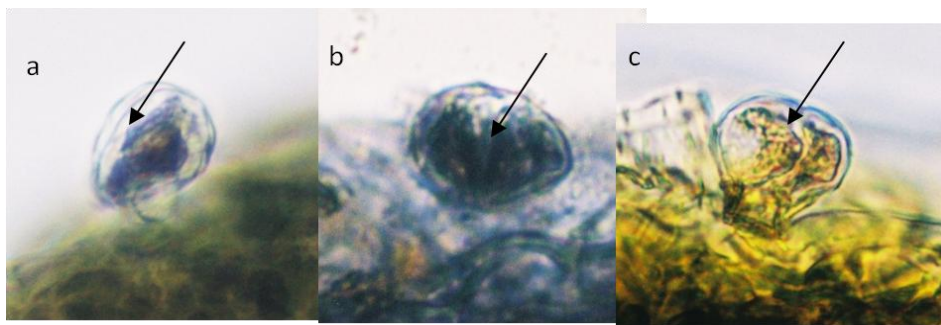
Das condições de controlo resultaram 46 plântulas. A densidade observada de tricomas foi elevada. Os tricomas capitados tipo I e os tricomas peltados são os que aparecem mais frequentemente e apresentaram resultados iguais neste ensaio, deram positivo e negativos nos mesmos testes. Foi também encontrado um tricoma misto. As plântulas de controlo produziram compostos que fazem parte das secreções típicas desta planta, como lípidos e terpenóides (Feijão, 2011). A produção de compostos começou no cotilédone, como observado em fluorescência, e manteve-se até ao estágio mais avançado observado, 3ª folha (Figura 2; Tabela 1). Os compostos detetados eram bastante evidentes, ou seja a intensidade de cor nos testes era intensa, aquando a realização dos testes histoquímicos e observações de fluorescência.



**Figura 2: a)** Tricoma capitado I da 1ª folha com secreção (seta), 20x em MOF; **b)** Tricoma peltado da 3ª folha com secreção (seta), 20x em MOF; **c)** Tricoma capitado tipo II da 1ªfolha com secreção (seta), 20x em MOF.

Os resultados positivos dos testes histoquímicos traduziram a produção dos seguintes compostos: ortodihidroxifenóis, mucilagens, terpenóides, quer em tricomas capitados tipo I e tricomas peltados das três primeiras folhas (Figura 3; Tabela 1). Os restantes testes foram negativos ou não foram realizados neste ensaio, devido à falta de material.

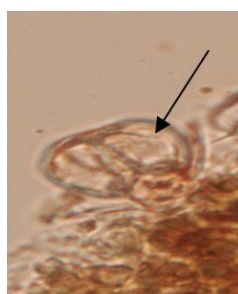




**Figura 3:** **a)** Detecção positiva de ortodihroxifenóis (seta) em tricoma capitado tipo I, 40x, MO; **b)** Detecção positiva de mucilgens (seta), tricoma capitado tipo I, 40, MO; **c)** Detecção positiva de terpenóides (seta), tricoma capitado tipo I, 40x, MO.

#### 4.2 Regime fotoperiódico 12h luz/12h escuro:

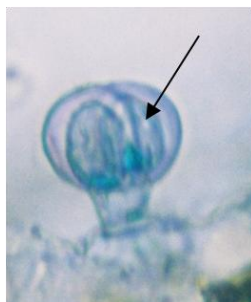
Neste regime fotoperiódico houve uma diminuição da densidade de tricomas secretores, nomeadamente de peltados e capitados tipo II. Neste ensaio só foram registados dados relacionados com tricomas capitados tipo I. As observações de fluorescência revelaram a produção de secreções nas três primeiras folhas observadas. Foram detetadas diferenças ao nível da composição química das secreções dos tricomas, no último estágio observado, a 3ª folha. Na primeira folha os testes positivos indicaram a produção de ortohidroxifenóis, alcalóides, lípidos e terpenóides, não se tendo observado a produção de fenóis, como tinha acontecido no controlo. Na segunda folha detectaram-se algumas diferenças em relação ao controlo tendo sido positivos os seguintes testes: ortohidroxifenóis, lípidos e óleos essenciais, e negativos os testes para a deteção de fenóis, mucilagens, polissacáridos, polissacáridos ácidos, terpenóides e esteróides. A terceira folha só produziu lípidos e óleos essenciais, sendo que todos os outros testes deram negativo (Figura 4; Tabela 1).



**Figura 4:** Resultado negativo do teste vermelho de sudão III, tricoma capitado tipo I, 3ª folha, sem secreção (seta). 40x, MO.

#### 4.3 Regime fotoperiódico 8h luz e 16h escuro:

A densidade de tricomas foi muito baixa, pelo que focamos as observações nos mais abundantes, os capitados tipo I. As observações de fluorescência revelaram de forma pouco evidente a produção de secreções. Neste regime fotoperiódico, todos os testes histoquímicos deram resultado negativo, exceto o azul do Nilo que revela produção de lípidos (Figura 5; Tabela 1). Os resultados foram constantes nas duas primeiras folhas observadas, sendo que estas apresentaram resultados iguais.



**Figura 5:** Resultado positivo do teste azul do Nilo, tricoma capitado tipo I, 3ª folha, com secreção lipídica (seta), 40x, MEV.

	Controlo (16 Luz, 8h Escuro)				12h Luz, 12h Escuro			8h Luz, 16h Escuro	
	Capitado I		Peltados		Capitado I			Capitado I	
	1ªfolha	2ªfolha	1ªfolha	2ªfolha	1ªfolha	2ªfolha	3ªfolha	1ªfolha	2ªfolha
Ortodihidroxifenóis (Cloreto de Ferrol III)	positivo	n.a	n.a	n.a	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
Fenóis com OH livre (Dicromato de Potássio)	negativo	n.a	negativo	n.a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Alcalóides (Reagente de Dittmar)	negativo	n.a	negativo	n.a	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
Mucilagens (Ácido tânico)	positivo	positivo	positivo	positivo	n.a	negativo	negativo	negativo	negativo
Polissacáridos (PAS)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	negativo	negativo	negativo	negativo
Lípidos (Vermelho de Sudão III)	n.a	n.a	n.a	n.a	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo
Lípidos neutros e ácidos (Azul do Nilo)	n.a	positivo	n.a	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Óleos Essenciais (Reagente de Nadi)	n.a	negativo	n.a	negativo	n.a	positivo	positivo	negativo	negativo
Terpenóides (2,4 Dinitrofenilhidrazina)	positivo	n.a	n.a	n.a	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
Esteróides (Tricloreto de antimónio)	negativo	n.a	n.a	n.a	n.a	negativo	negativo	negativo	negativo
Polissacáridos ácidos (Azul alciano)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	negativo	negativo	n.a	n.a
Pectinas (Vermelho de ruténio)	n.a	n.a	n.a	n.a	positivo	positivo	positivo	n.a	n.a

n.a- Não aplicavel

**Tabela 1:** Tabela resumo dos resultados dos testes histoquímicos, obtidos na 1ª, 2ª e 3ª folhas após exposição a diferentes regimes fotoperiódicos (controlo, 12 luz/12h escuro e 16h luz/ 8h escuro).

## 5. Discussão

Normalmente, a produção de óleos é analisada em plantas com flor, em estado adulto. No entanto neste estudo observamos uma produção de óleos, ainda que pequena, logo nos cotilédones. Em condições de controlo as plântulas de *Lavandula pedunculata*, apresentaram elevada densidade de tricomas secretores de diferentes tipos, que produziram secreções em quantidades significativas. É possível avaliar de forma indireta a quantidade de secreção produzida pela intensidade da cor que as observações de fluorescência e histoquímica apresentam, sendo que quanto mais intensa a cor mais a quantidade de secreção. O teste histoquímico que pretendeu detetar produção de óleos essenciais também foi positivo. Ainda nas condições de controlo os fenóis, alcalóides e esteróides foram negativos. A síntese destes compostos está muito associada a condições de defesa, pelo que se a plântula não os produziu é porque estava em condições que não lhe ofereciam condições adversas. Importa referir que, os lípidos foram os únicos compostos que estiveram presentes em todos os regimes estudados.

Quando diminuimos o fotoperíodo da *Lavandula*, houve alterações na produção de secreções. Estas mudanças começaram a notar-se em estágios mais desenvolvidos da planta, uma vez que as plantas só foram submetidas ao novo regime fotoperiódico após 8 dias em condições de controlo, logo já existiram estruturas que se desenvolveram no novo regime fotoperiódico. Assim as diferenças observadas respeitavam maioritariamente nas folhas que já se desenvolveram no novo fotoperíodo.

As mudanças mais visíveis ocorreram no regime fotoperiódico de 8h luz/16h escuro. Neste regime, invertendo totalmente o fotoperíodo a que crescem as plântulas, a quantidade de secreção baixou consideravelmente, dado que a intensidade de cor nas observações de fluorescência e histoquímica foi mais baixa. As plântulas, deste regime, responderam produzindo apenas lípidos. Os lípidos são constituintes importantes de várias estruturas, como as membranas celulares, por isso é normal que em condições desfavoráveis este tipo de compostos continue a ser produzido dado a sua importância. No regime 12h luz/12h escuro, foram observadas menos diferenças entre plântulas do que no regime anterior. Neste regime a característica dominante foi, os testes darem positivo na primeira e na segunda folha, e depois na terceira darem negativo. Assim percebemos que durante os primeiros dias do desenvolvimento das plântulas, a mudança de regime fotoperiódico vai afetar, neste caso, a densidade e tipo de tricomas secretores presentes. Na primeira e segunda folha, ainda foram produzidos ortodihidroxifenóis mas na terceira já não e a mesma situação deu-se para a produção de alcalóides e terpenóides, que ajudam na protecção contra insectos e herbívoros (Cosi, 1999). Na terceira folha, que já se desenvolveu no novo regime fotoperiódico, foi onde surgiram as alterações. Mesmo quando os testes eram positivos a quantidade de composto foi bastante mais baixa que na condição de controlo.

Estes resultados seriam de esperar uma vez que é comum que em condições desfavoráveis, seja afetada a produção de metabólitos secundários, uma vez que estes não atuam diretamente no desenvolvimento da planta. É necessário que a planta em condições de *stress* reaja e proteja as vias que são fundamentais para o seu desenvolvimento.

Verifica-se que a produção de diversos compostos começa bastante cedo no desenvolvimento das plântulas, pelo que terão provavelmente função de defesa.

## 6.Referências bibliográficas

- Ascensão L, Marques N, Pais MS, (1995). *Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of Leontis leorunus (Lamiaceae)*. Annals of Botany 75: 619-626.
- Borges ASLR, (2010). *Morphological characterization and essential oil of Lavandula luisieri populations from Alentejo, Portugal*. Relatório final de iniciação à investigação, 11pp.
- Corsi G, Bottega S, (1999). *Glandular hairs of Salvia officinalis: New data on morphology, lacation histochemistry in relation to function*. Annals of Botany 84: 657-664.
- David R, Carde JP, (1964). *Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moyen du reactif de Nadi*. C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D 258: 1338-1340
- Feijão, MDM, (2011). *A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de Campo, CBA): caracterização micromorfológica e dos óleos essenciais de Lavandula luisieri*. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, 65pp.
- Feder N, O'Brien TP, (1968). *Plant microtechnique: Some principles and new methods*. Am J Bot 55:123 – 142.
- Furr Y, Mahlberg PG, (1981). *Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in Cannabis sativa*. Jornal of Natural Products 44: 153-159.
- Franco JA, (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) II* Sociedade Astória, Lda. Lisboa.
- Ganter P, Jollès G, (1969,1970). *Histologie normale et pathologique*. Vols. 1, 2 Gauthier- Villars, Paris.
- Gersbach PV, (2002). *The essential oil secretory structures of Pronstanthera ovalifolia (Lamiaceae)*. Annals of Botany 89: 255-260.
- Hayat MA, (1981). *Principles and technics of electron microscopy: biological applications*, vol.1 2nd ed. University Park Press, Baltimore, Maryland 522p.
- Johasen DA, (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, Nova Iorque.
- Liu M, Liu J, (2012). *Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the leaves of Isodon rubescens (Lamiaceae)*. African Journal of Biotechnology 11: 4069-4078.
- Mace MZ, Howell CR, (1974). *Histochemistry and identification of condensed tanin precursors in roots of cotton seedlings*. Can J Bot 52:2423 – 2426
- Moreira I, Teixeira G, Monteiro A, (2010). *Anatomia das plantas, estruturas secretoras*. ISA Press, Lisboa.
- Pizzolato TD, Lillie RD, (1973). *Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins*. Jornal of Histochemistry and Cytochemistry 21: 56-64.

Satıl F, Kaya A, (2007). *Leaf anatomy and hairs of turkish Satureja L. (Lamiaceae)*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 49/1: 67-76.

Salmaki Y, Zarre S, Jamzad Z, Brauchler C, (2009). *Trichome micromorphology of Iranian Stachys (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication*. Flora 204: 371–381.

Teixeira G, (1999). *Estudo biológico e fitoquímico de Azolla filiculoides Lam. e de A. pinnata subsp. africana (Desv.) R. M. K. Saunders & K. Fowler*. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, 222 pp.

Trapp SC, Croteau RB, (2001). *Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications*. Genetics Society of America 58: 811-852.